

German Patent No. 29 30 542  
(Offenlegungsschrift)

---

Job No.: 522-100032

Ref.: DE2930542A

Translated from German by the Ralph McElroy Translation Company  
910 West Avenue, Austin, Texas 78701 USA

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY  
GERMAN PATENT OFFICE  
PATENT NO. 29 30 542  
(Offenlegungsschrift)

Int. Cl.<sup>3</sup>: C 07 C 103/52  
C 07 C 102/00  
A 61 K 37/26

Filing No.: P 29 30 542.8

Filing Date: July 27, 1979

Publication Date: February 12, 1981

NEW INSULIN DERIVATIVES AND A METHOD FOR PRODUCING THEM

Inventors:

Dr. Rainer Obermeier  
6234 Hattersheim

Dr. Rainer Uhmann  
6239 Kriftel

Dr. Hans-Dieter Summ  
6230 Frankfurt

Dr. Günter Regitz  
6232 Bad Soden

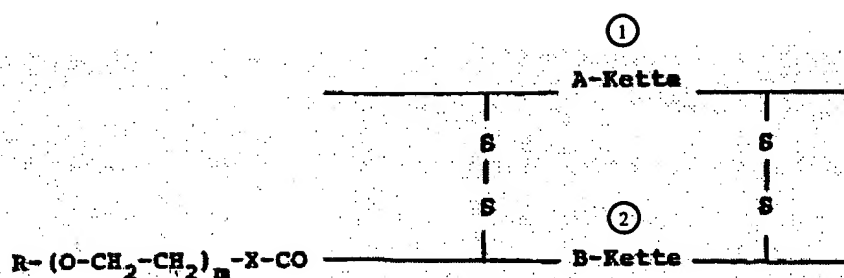
Dr. Karl Geisen  
6000 Frankfurt

Applicant:

Hoechst AG  
6000 Frankfurt

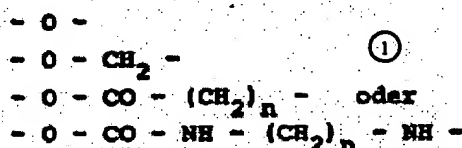
Claims

1. An insulin derivative, which is characterized by the fact that the  $\alpha$ -amino group of the B chain of the insulin is bonded to monoalkyl polyethylene glycol via an intermediate member.
2. An insulin derivative of formula I



Key: 1      A chain  
       2      B chain

in which R means alkyl with 1-4 carbon atoms and X is

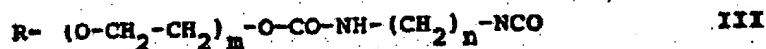
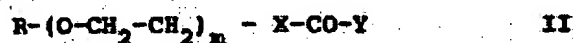


Key: 1      or

where n is 2-8 and m is 10 to about 120.

3. A method for producing an insulin derivative, which is characterized by the fact that an insulin provided with protecting groups in positions  $N^{\alpha A1}$  and  $N^{\epsilon B29}$  is reacted with an alkyl polyethylene glycol derivative and then the protecting groups are removed.

4. A method for producing an insulin derivative of formula I, which is characterized by the fact that  $N^{\alpha A1}$ ,  $N^{\epsilon B29}$ -bis-tert-butyloxycarbonyl insulin or  $N^{\alpha A1}$ ,  $N^{\epsilon B29}$ -bis-methylsulfonylethylloxycarbonyl insulin is reacted with an alkyl polyethylene glycol derivative of general formula II or III, respectively,



in which R, X, m and n have the meanings given above and Y means chlorine, an active ester group or an azide, and the tert-butyloxycarbonyl or methylsulfonylethylloxycarbonyl groups are removed by treatment with acid or alkali, respectively.

5. Agents containing an insulin derivative as in Claim 1 in an aqueous dispersion.

6. A method for treating diabetes mellitus, which is characterized by parenteral administration of an agent as in Claim 5.

Polyethylene glycol (PEG) is often covalently bonded to proteins in order to increase their hydrophilicity and reduce antigenicity.

For instance, the reaction of 2-chloro-4-hydroxy-6-PEG with a pollen allergen is described in Arch. Biochem. Biophys.

The reaction of this compound with a number of enzymes and with insulin is reported in the Dutch Patent Application 7409770. The resulting conjugates still has 50% insulin activity, with respect to the amount of underlying insulin.

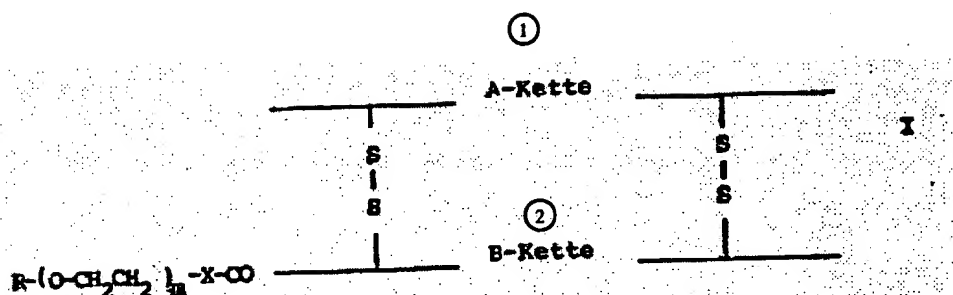
If one follows Example 10 of the Dutch patent application a uniform product is not obtained. A part of the insulin is converted at all three amino groups, while a part is converted only at two or one amino group. A similar result is obtained if an activated succinic acid mono-PEG ester, which is likewise proposed in said application, is reacted with insulin.

Information about the structure of the resulting compounds is obtained by an Edman degradation. If the amino acid composition of the reaction product (3 phenylalanine residues) is tested before and after the Edman degradation, one finds that the phenylalanine content has decreased from 3.0 to about 2.5. On the other hand, the content of trisubstituted insulin, determined by acid electrophoresis, is about 50%. This means that the amino group of the B1 phenylalanine has to be free in mono- and disubstituted insulins. Thus, besides the trisubstituted insulin there result derivatives in which the amino groups in A1 and B29 in these two positions are simultaneously substituted. An insulin substituted only in B1 is not present. This finding tallies with the reactivity of insulin known from Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352 (1971), p. 1487, according to which in an alkaline solution the amino groups in A1 and B29 preferably react, while the amino group in B1 is present in substituted form only in the tri-substituted derivatives.

It was now surprisingly found that a 100% effective PEG-substituted insulin is obtained if a PEG derivative is selectively reacted with the amino group of B1 phenylalanine. This result is surprising since, for example, B1 stearylinsulin ineffective in vivo (decrease of blood sugar in rabbits).

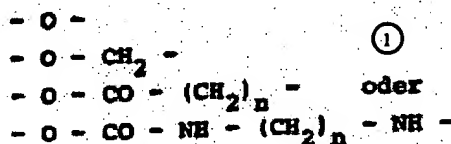
Thus, the object of the invention consists of insulin derivatives that are characterized by the fact that in them the  $\alpha$ -amino group of the B chain of the insulin is bonded to a monoalkyl polyethylene glycol via an intermediate member.

Especially preferred are derivatives of the general formula I



Key: 1 A chain  
2 B chain

in which R means alkyl with 1-4 C atoms and X means

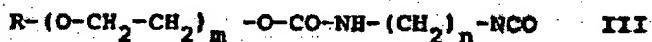


Key: 1 or

where n is 2-8 and m 10 to about 120.

An object of the invention is also a method for producing insulin derivatives that is characterized by the fact that an insulin provided with protecting groups in positions  $N^{aA1}$  and  $N^{eB29}$  is reacted with an alkyl polyethylene glycol derivative and then the protecting groups are removed.

Thus, to produce insulin derivatives of general formula I  $N^{aA1}$ ,  $N^{eB29}$ -bis-tert-butyloxycarbonyl insulin or  $N^{aA1}$ ,  $N^{eB29}$ -bis-methylsulfonylethyloxycarbonyl insulin is reacted with an alkyl polyethylene glycol derivative of general formula II or III

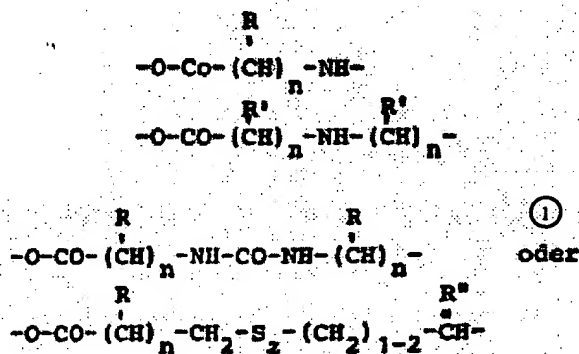


in which R, X, m and n have the meanings given above and Y is chlorine, an active ester group or azide, and the tert-butyloxycarbonyl or methylsulfonylethyloxycarbonyl groups are eliminated by treatment with acid or alkali, respectively.

Basically, monoalkyl-PEG can be bonded to the  $\alpha$ -amino group of the B chain by using as intermediate member any desired low molecular residue that covalently bonds the free OH

group of the polyethylene glycol to the amino group. The character of the intermediate member has little effect on the properties of the insulin derivatives in accordance with the invention.

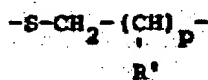
Thus, besides the intermediate members noted above, intermediate members like



Key: 1 or

can also be introduced for -X- using the generally known methods of organic chemistry, particularly peptide chemistry. In these formulas z means 1 or 2.

Instead of the ester bond, an amide bond to  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-$  can be produced by proceeding from the corresponding  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$  in accordance with the Dutch Patent Application 7409770. Intermediate members of the structure



can also be obtained with mercapto compounds via a corresponding halogen compound. In this formula p is a whole number between 1 and 8 and R' means hydrogen or alkyl with 1-4 carbon atoms. If  $p = 1$ , R' can also be the side chain of a naturally occurring  $\alpha$ -amino acid in L, D or DL form or can mean acylamino.

Heterocyclic systems like the well-known 4-hydroxy-1,3,5-triazine, can also serve as intermediate members, wherein in said compound the crosslinking sites are in position 2 and 6.

An alkyl polyethylene glycol derivative of formula III can be obtained by the reaction of  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{OH}$  with hexamethylene diisocyanate.  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{ONSu}$  (ONSu is N-hydroxysuccinimidyl) is prepared from  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{OH}$  with succinic anhydride and subsequent conversion with dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and N-hydroxysuccinimide (HONSu).  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{N}_3$  is obtained from  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{OH}$  and methyl chloroacetate, and reacting the reaction product with hydrazine and

converting the hydrazide to the azide.  $R-(O-CH_2-CH_2)_m-O-CO-Cl$  is obtained from  $R-(O-CH_2-CH_2)_m-OH$  with excess phosgene.

Insulin derivatives partially protected with tert-butyloxycarbonyl (Boc) or methylsulfonylethyloxycarbonyl (Msc) are known from Hoppe-Seyler's *Z. physiol. Chem.* 352 (1971), p. 1487 and *Chem. Ber.* 108 (1975), p. 2758.

The reaction of the alkyl polyethylene glycol derivatives of general formulas II and III with the partially protected insulin derivatives can take place in solvents like dimethylformamide or dimethyl sulfoxide. Pyridine is also suitable.

The addition of a tertiary base like triethylamine or N-methylmorpholine is recommended.

The reaction is allowed to take place preferably at room temperature, but slight heating to a temperature under the denaturing temperature of the peptide may be necessary.

The reaction is continued until complete acylation has occurred. This can be established, for example, by means of paper electrophoretic testing in accordance with Hoppe-Seyler's *Z. physiol. Chem.* 352 (1971), p. 1487.

The methods that are known in peptide chemistry serve to eliminate the protecting groups.

Thus, to eliminate Boc groups the insulin derivative can be dissolved in a suitable agent such as trifluoroacetic acid and after about 45 min the insulin derivative is precipitated, for example with ether.

The Msc group can be eliminated, according to *Chem. Ber.* 108 (1975), p. 2758, by storing the compound in an alkaline dimethylformamide-methanol-water solution for a short time. The compound can then be isolated by acidification, for example with acetic acid, and precipitation, for example with ether or acetic acid.

Filtration via a column, for example Sephadex® G15 or Biogel P2, can be connected next for desalting. Sephadex is a crosslinked dextran gel, while Biogel is a crosslinked polyacrylamide.

Chromatographic purification of the compounds can be carried out in the still protected form by partition chromatography by analogy with Hoppe-Seyler's *Z. physiol. Chemie* 354 (1973), p. 1285.

The purification of the compounds can also take place by elimination of the protecting groups by chromatography, for example on Sephadex® G-50 or Biogel P6, with simultaneous desalting.

The new insulin derivatives serve as drugs for treatment of diabetes mellitus. Accordingly, an object of the invention is also an agent that contains one of said insulin derivatives in an aqueous dispersion and the use of this agent to treat diabetes mellitus.

A particular advantage of the insulin derivatives in accordance with the invention lies in the fact that their effect on fat cells is highly reduced. For example, B1-methyl-PEG (1500)-succinoyl insulin shows over 100% insulin activity in blood sugar reduction in rabbits, compared on a molar basis, while only 65% was found in the fat cell test. The enhanced and prolonged insulin activity of the compounds in accordance with the invention over natural insulin becomes particularly clear in tests on the adrenalectomized strepto rat.

With the new insulin derivatives the physician for the first time has available compounds that develop the known anabolic insulin activity preferably on muscle tissue and less on fat tissue. With that a long sought division of activity has been achieved.

Moreover, the insulin derivatives in accordance with the invention have highly reduced antigenicity.

The following examples illustrate the preparation of the new compounds. Insulins from various species such as cow, pig or humans can be used as starting material.

#### Example 1

B1-Methyl-PEG(1500)-carbonylamino-hexamethylenaminocarbonyl insulin (cow)

a) Monoisocyanate from methyl polyethylene glycol (1500) and hexamethylene diisocyanate

15 g monomethyl polyethylene glycol (MW 1500) is dissolved in 200 mL benzene under heat. The solution is mixed with 1 mL dibutyltin laurate and 8.6 mL hexamethylene diisocyanate and heated under reflux for 4 h. After cooling, the product is precipitated by adding petroleum, the supernatant is decanted, the solid is dissolved in toluene, and the solution is again mixed with petroleum ether. The precipitation is repeated two more times, the product is vacuum filtered and vacuum dried. Yield: 14.6 g; characterization by IR spectrum ( $1705\text{ cm}^{-1}$  amide;  $2260\text{ cm}^{-1}$  isocyanate).

b) 200 mg  $\text{N}^{\text{A1}}$ ,  $\text{N}^{\text{B29}}$ -bis-Boc insulin from cow prepared in accordance with German Patent No. 2 162 164 is mixed with 400 mg of the compound prepared in (a) for 18 h at room temperature in 3 mL dimethylformamide that contains 0.2 mL N-ethylmorpholine. The precipitate is precipitated with ether and washed with ether and ethyl acetate. The yield after vacuum drying is 278 mg. Since the product is sufficiently uniform according to electrophoresis, chromatographic purification can be skipped.

To remove the protecting groups, the product is dissolved in 2 mL trifluoroacetic acid and 243 mg reaction product is precipitated with ether after standing for 45 min at room temperature. After dissolving the precipitate in 2 mL 0.1M ammonium acetate/0.1N acetic acid the solution is chromatographed through a Sephadex® G-50 superfine column 1 x 50 cm with 0.1M ammonium acetate/0.1N acetic acid. Yield: 218 mg.



The compound is uniform in paper electrophoresis at pH 2 and as expected behaves like a monoacylated insulin.

### Example 2

#### B1-Methyl-PEG (500) succinoyl insulin (pig)

##### a) Succinic acid monomethyl polyethylene glycol ester (500)

15 g Monomethyl polyethylene glycol (500) is dissolved in 40 mL methylene chloride, 5 g succinic anhydride is added, and the mixture is stirred overnight at room temperature. Then the reaction mixture is boiled at reflux for 1 more h. After cooling the solvent is removed in a vacuum and the residue is dissolved in 5 g portions in methanol and chromatographed via Sephadex LH 20 in methanol. The substance is tested for purity in a thin layer chromatography system methylene chloride/diethylene glycol monomethyl ether/pyridine (85:15:2 v/v). IR spectrum:  $1740\text{ cm}^{-1}$ .

##### b) Succinic acid monomethyl polyethylene glycol ester (500) mono-N-hydroxysuccinimide ester

1.8 g (3 mmol) succinic acid monomethyl polyethylene glycol ester (500) is dissolved in 20 mL tetrahydrofuran and 345 mg (3 mmol) N-hydroxysuccinimide and 620 mg DCC are added to the solution. The mixture is stirred for 24 h at room temperature and then separated from the precipitate that is formed. Then the solvent is removed in a vacuum and the remaining oil is covered with ether and cooled to  $-20^{\circ}\text{C}$  for crystallization. The supernatant is decanted and the crystalline residue is heated to room temperature, whereupon the crystals again liquefy. This crystallization is repeated. The substance can be stored under dry ether. Yield: 1.6 g. Characterization by IR spectrum ( $1820, 1890, 1740\text{ cm}^{-1}$ ).

##### c) B1-Methyl-PEG (500) succinoyl insulin (pig)

3.0 g  $\text{N}^{\text{A1}}, \text{N}^{\text{B29}}$ -bis-Msc insulin from pig, prepared according to Chem. Ber. 108 (1975), p. 2758, is dissolved in 40 mL dimethylformamide and 0.09 mL N-ethyl morpholine. 1.0 g methyl-PEG (500)-succinoyl-ONSu is added and stirred overnight at room temperature. For further processing this is mixed with 0.1 mL acetic acid, the reaction product is precipitated with ether and washed with methyl chloride and ether. Yield: 4.0 g.

Purification takes place by partition chromatography by analogy with Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 354 (1973), p. 1285, in a 200 x 6 cm column. The insulin concentration in the eluate is determined by measuring the UV extinction at 254 nm. The fractions of the main peak, which are chromatographically uniform (Thin layer chromatography on silica gel. Eluent chloroform/methanol/water/glacial acetic acid (60:45:14:3)) are combined. Yield: 2.1 g.

To remove the Msc protecting groups, the substance from which the solvent has been removed is dissolved in 10 mL dimethylformamide and at 0°C mixed with 10 mL methanol and 20 mL 1N NaOH while stirring. After 45 sec 20 mL 1N acetic acid and 2.0 g insulin derivative are precipitated with acetic acid/ether (1:1) and desalted by gel filtration by analogy with Example 2. Yield: 1.85 g.

### Example 3

#### B1-Methyl-PEG(1500)-succinoyl insulin (pig)

3.5 N<sup>αA1</sup>, N<sup>εB29</sup>-bis-Boc insulin (pig) is stirred overnight at room temperature in a solution of 40 mL dimethylformamide and 0.09 mL N-ethyl morpholine with 8.0 g methyl-PEG(1500) succinoyl-ONSu prepared by analogy with Example 2.

For further processing it is mixed with 0.1 mL acetic acid, the reaction product is precipitated with ethyl and washed with methylene chloride and ether. Yield: 4.5 g. Purification by partition chromatography is carried out by analogy with Example 2. Yield: 2.8 g.

The protecting groups are removed as in Example 1 and the product is desalted as in Example 2. Yield: 2.5 g. The purity of the compound corresponds in polyacrylamide gel electrophoresis to that of chromatographically purified insulin.

⑤

Int. Cl. 3:

**C 07 C 103/52**⑯ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

C 07 C 102/00

A 61 K 37/26

**DEUTSCHES****PATENTAMT****BEST AVAILABLE COPY****DE 29 30 542 A 1**

⑪

**Offenlegungsschrift 29 30 542**

⑫

Aktenzeichen:

P 29 30 542.8

⑬

Anmeldetag:

27. 7. 79

⑭

Offenlegungstag:

12. 2. 81

⑮

Unionspriorität:

⑮ ⑯ ⑰

⑱

Bezeichnung:

Neue Insulinderivate und Verfahren zu ihrer Herstellung

⑲

Anmelder:

Hoechst AG, 6000 Frankfurt

⑳

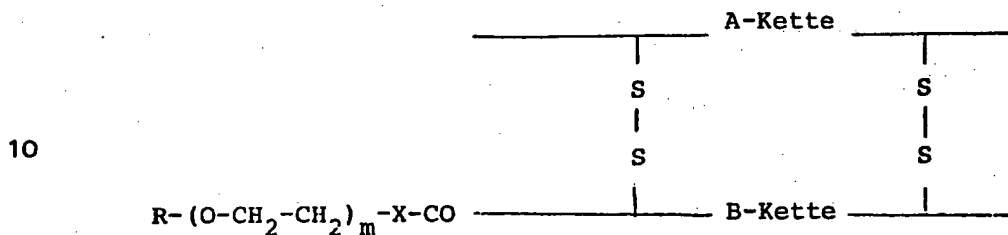
Erfinder:

Obermeier, Rainer, Dipl.-Chem. Dr., 6234 Hattersheim;  
 Uhmann, Rainer, Dipl.-Chem. Dr., 6239 Kriftel;  
 Summ, Hans-Dieter, Dipl.-Chem. Dr., 6230 Frankfurt;  
 Regitz, Günter, Dr., 6232 Bad Soden; Geisen, Karl, Dr., 6000 Frankfurt

## Patentansprüche:

1. Insulinderivat, dadurch gekennzeichnet, daß die  $\alpha$ -Amino-  
gruppe der B-Kette des Insulins über ein Zwischenglied  
mit Monoalkylpolyethylenglykol verknüpft ist.

5 2. Insulinderivat der Formel I



15 in der R Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen und X

- O -

- O - CH<sub>2</sub> -

- O - CO - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - oder

- O - CO - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - NH -

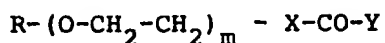
20

bedeutet, wobei n 2 bis 8 und m 10 bis etwa 120 ist.

25 3. Verfahren zur Herstellung eines Insulinderivats, dadurch  
gekennzeichnet, daß man ein in den Positionen N <sup>$\alpha$</sup> A1 und  
N<sup>B29</sup> mit Schutzgruppen versehenes Insulin mit einem  
Alkylpolyethylenglykol-Derivat umsetzt und danach die  
Schutzgruppen abspaltet.

30 4. Verfahren zur Herstellung eines Insulinderivats der  
Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man N <sup>$\alpha$</sup> A1, N<sup>B29</sup>-  
Bis-tert.butyloxycarbonyl-Insulin oder N <sup>$\alpha$</sup> A1, N<sup>B29</sup>-  
Bis-methylsulfonylethylloxycarbonyl-insulin mit einem Alky-  
polyethylenglykol-Derivat der allgemeinen Formel II bzw.  
III umsetzt

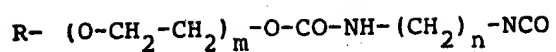
35



II

030067/0395

ORIGINAL INSPECTED

~~12~~  
2

III

in der R, X, m und n die obengenannte Bedeutung haben und  
 Y Chlor, eine Aktivestergruppe oder Azid darstellt und die  
 5 tert.-Butyloxycarbonyl- bzw. Methylsulfonylethyloxycar-  
 bonyl-gruppen durch Behandeln mit Säure bzw. Lauge ab-  
 spaltet.

5. Mittel, enthaltend ein Insulinderivat gemäß Anspruch 1  
 10 in wäßriger Dispersion.

6. Verfahren zur Behandlung des Diabetes mellitus, gekenn-  
 zeichnet durch die parenterale Verabreichung eines Mittels  
 gemäß Anspruch 5.

030067/0395

Hoechst AG

Neue Insulinderivate und Verfahren zu ihrer Herstellung

- 5 Polyethylenglycol (PEG) wird häufig covalent mit Proteinen verbunden, um deren Hydrophilie zu steigern und die Antigenität zu verringern.

- 10 So ist in Arch. Biochem. Biophys die Reaktion von 2-chlor-4-hydroxy-6-PEG mit einem Pollen-Allergen beschrieben.

- 15 In der niederländischen Patentanmeldung 7409770 wird über den Umsatz derselben Verbindung mit mehreren Enzymen und mit Insulin berichtet. Das resultierende Konjugat besitzt noch 50 % Insulinaktivität, bezogen auf den Anteil des zu Grunde liegenden Insulins.

- 20 Folgt man dem Beispiel 10 der niederländischen Patentanmeldung, so erhält man kein einheitliches Produkt. Ein Teil des Insulins ist an allen 3 Aminogruppen umgesetzt, ein Teil nur an zwei oder einer Aminogruppe. Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn man einen aktivierten Bernsteinsäure-mono-PEG-ester, der ebenfalls in der genannten Anmeldung vorgeschlagen wird, mit Insulin umsetzt.

- 25 Über die Struktur der entstandenen Verbindungen erhält man durch einen Edman-Abbau Auskunft. Prüft man die Aminosäurezusammensetzung des Reaktionsprodukts (3 Phenylalaninreste) vor und nach Edman-Abbau, so stellt man fest, daß der Phenylalanin-gehalt von 3.0 auf etwa 2.5 zurückgegangen ist.
- 30 Andererseits beträgt der durch saure Elektrophorese ermittelte Gehalt an dreifach substituiertem Insulin etwa 50 %. Das bedeutet, daß die Aminogruppe des B1-Phenylalanins in mono- und disubstituierten Insulinen frei sein muß. Es sind also neben dem trisubstituierten Insulin Derivate entstanden, bei denen die Aminogruppen in A1 und B29 in diesen beiden Positionen gleichzeitig substituiert sind. Ein nur in B1-substituiertes Insulin liegt nicht vor. Dieser Befund deckt

030067/0395

ORIGINAL INSPECTED

-2- 4

sich mit der aus Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352 (1971), S. 1487 bekannten Reaktivität des Insulins, wonach in alkalischer Lösung bevorzugt die Aminogruppen in A1 und B29 reagieren, während die Aminogruppe in B1 nur in den trisubstituierten Derivaten in substituierter Form vorliegt.

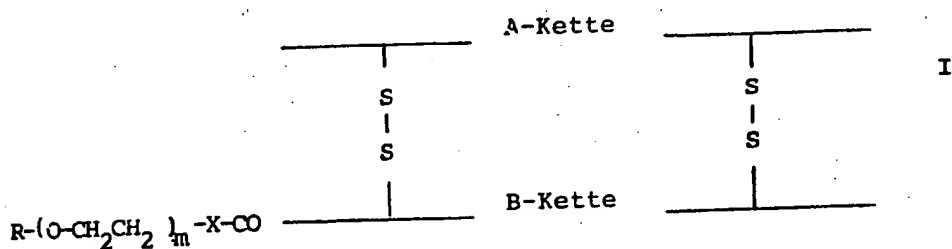
Es wurde nun überraschend gefunden, daß man ein 100% wirksames PEG-substituiertes Insulin erhält, wenn man ein PEG-Derivat gezielt mit der Aminogruppe von B1-Phenylalanin umsetzt. Dieses Ergebnis ist deshalb überraschend, weil z.B. B1-Stearoylinsulin in vivo (Blutzuckersenkung am Kaninchen) wirkungslos ist.

Gegenstand der Erfindung sind somit Insulinderivate, welche dadurch gekennzeichnet sind, daß in ihnen die  $\alpha$ -Aminogruppe der B-Kette des Insulins über ein Zwischenglied mit einem Monoalkylpolyethylenglycol verknüpft ist.

Besonders bevorzugt sind Derivate der allgemeinen Formel I

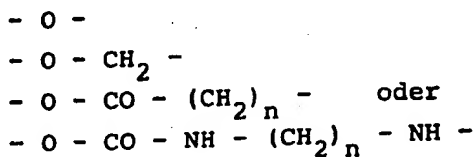
20

25



in der R Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen und X

30



bedeutet, wobei n 2 bis 8 und m 10 bis etwa 120 ist.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung von Insulinderivaten, das dadurch gekennzeichnet

030067/0395

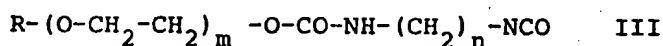
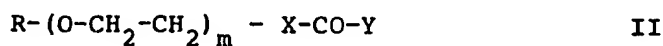
-8- 5

ist, daß man ein in den Positionen  $N^{\alpha}A1$  und  $N^{B29}$  mit Schutzgruppen versehenes Insulin mit einem Alkylpolyethylenglycol-Derivat umsetzt und danach die Schutzgruppen abspaltet.

5

So kann zur Herstellung von Insulinderivaten der allgemeinen Formel I  $N^{\alpha}A1, N^{B29}$ -Bis tert.butyloxycarbonyl-Insulin oder  $N^{\alpha}A1, N^{B29}$ -Bis-methylsulfonylethyl-oxycarbonyl-Insulin mit einem Alkylpolyethylenglycol-derivat der allgemeinen Formel II bzw. III umgesetzt

10



15

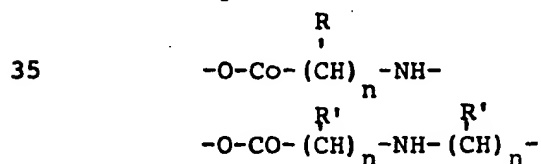
in der R, X, m und n die obengenannte Bedeutung haben und Y Chlor, eine Aktivestergruppe oder Azid darstellt, und die tert.-Butyloxycarbonyl-bzw. Methylsulfonylethyl-oxycarbonyl-gruppen durch Behandeln mit Säure bzw. Lauge abgespalten werden.

20

An sich kann Monoalkyl-PEG über jeden beliebigen niedermolekularen Rest als Zwischenglied mit der  $\alpha$ -Aminogruppe der B-Kette des Insulins verbunden sein, der die freie OH-Gruppe des Polyethylenglycols mit der Aminogruppe kovalent verknüpft. Der Charakter des Zwischengliedes beeinflusst die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Insulinderivate kaum.

25

30 So lassen sich neben den oben bereits genannten Zwischengliedern mit den allgemein bekannten Methoden der organischen Chemie, speziell der Peptidchemie, für -X- auch Zwischenglieder wie

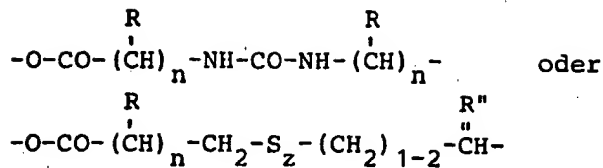


35

030067/0395

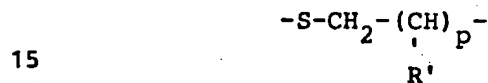


-6-



5 einführen. In diesen Formeln bedeutet z 1 oder 2.

Man kann auch anstelle der Esterbindung eine Amidbindung zum  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-$  herstellen, indem man gemäß der niederländischen Patentanmeldung 7409770 von dem entsprechenden  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{NH}_2$  ausgeht. Über eine entsprechende Halogenverbindung können mit Mercapto-Verbindungen auch Zwischenglieder der Struktur



15 erhalten werden. In dieser Formel ist p eine ganze Zahl zwischen 1 und 8 und R' Wasserstoff oder Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Wenn p = 1 ist, kann R' auch die Seitenkette einer natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Aminosäure, in der L-, D- oder DL-Form sein oder Acylamino bedeuten.

25 Auch heterocyclische Systeme, wie das bekannte 4-Hydroxy-1,3,5-triazin können als Zwischenglied dienen, wobei bei der genannten Verbindung die Vernetzungsstellen in 2- und 6-Position sind.

Ein Alkylpolyethylen-glycol-derivat der Formel III kann man erhalten durch Umsatz von  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{OH}$  mit Hexamethylendiisocyanat.  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{ONSu}$  (ONSu ist N-Hydroxy-succinimidyl) wird aus  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{OH}$  mit Bernsteinsäureanhydrid und anschließenden Umsatz mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N-Hydroxysuccinimid (HONSu) hergestellt.  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{N}_3$  erhält man aus  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{OH}$  und Chloressigsäure-methylester, Umsetzung des Reaktionsprodukts mit Hydrazin und Überführen des Hydrazids in das Azid.  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{O}-\text{CO}-\text{Cl}$  erhält man aus  $\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{OH}$  mit überschüssigem Phosgen.

030067/0395

-6- 7

Mit tert. Butyloxycarbonyl (Boc) oder Methylsulfonyl-ethyloxycarbonyl (Msc) partiell geschützte Insulinderivate sind aus Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352 (1971), S. 1487 und Chem. Ber. 108 (1975), S. 2758 bekannt.

5

Die Umsetzung der Alkylpolyethylen-glycol-derivate der allgemeinen Formeln II und III mit den partiell geschützten Insulinderivaten kann man in Lösungsmitteln wie Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid vornehmen. Auch Pyridin ist geeignet.

10

Zusatz einer tert. Base wie Triäthylamin oder N-Methylmorpholin ist empfehlenswert.

Die Reaktion wird bevorzugt bei Raumtemperatur ablaufen gelassen, jedoch kann leichtes Erwärmen auf eine Temperatur unterhalb der Denaturierungstemperatur des Peptids förderlich sein.

Die Umsetzung wird solange fortgesetzt, bis eine vollständige Acylierung eingetreten ist. Das läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer papierelektrophoretischen Prüfung nach Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352 (1971), S. 1487 feststellen.

25 Zur Abspaltung der Schutzgruppen dienen die in der Peptidchemie bekannten Verfahren.

30 So kann zur Abspaltung von Boc-Gruppen in einem geeigneten Mittel, zum Beispiel in Trifluoressigsäure gelöst und nach etwa 45 Minuten das Insulinderivat, z.B. mit Ether, ausgefällt werden.

35 Die Msc-Gruppe kann nach Chem. Ber. 108 (1975), S. 2758 durch kurzes Aufbewahren der Verbindung in alkalischem Dimethylformamid-Methanol-Wasser abgespalten werden. Die Verbindung wird danach durch Ansäuern, z.B. mit Essigsäure, und Ausfällen, z.B. mit Ether oder Essigsäure,

030067/0395

-6- 8

isoliert.

Zur Entsalzung kann sich eine Filtration über eine Säule, z.B. aus Sephadex <sup>(R)</sup>-G15 oder Biogel P2 anschließen.

- 5 Sephadex ist ein vernetztes Dextran-Gel, Biogel ein vernetztes Polyacrylamid.

- 10 Eine chromatographische Reinigung der Verbindungen kann in der noch geschützten Form durch Verteilungschromatographie analog Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 354 (1973), S.1285 vorgenommen werden.

Die Reinigung der Verbindungen kann auch nach Abspalten der Schutzgruppen durch Chromatographie, z.B. an Sephadex <sup>(R)</sup>G-50 oder Biogel P6 unter gleichzeitiger Entsalzung erfolgen.

15

- Die neuen Insulinderivate dienen als Arzneimittel zur Behandlung des Diabetes Mellitus. Demgemäß ist Gegenstand der Erfindung auch ein Mittel, das eine der genannten Insulinderivate in wäßriger Dispersion enthält und die Verwendung dieses Mittels zur Behandlung des Diabetes Mellitus.
- 20

- Ein besonderer Vorzug der erfindungsgemäßen Insulinderivate besteht darin, daß ihre Wirkung auf die Fettzelle stark reduziert ist. So zeigt z.B. B1-Methyl-PEG (1500)-succinoyl-insulin bei der Blutzuckersenkung am Kaninchen über 100% Insulinwirkung, verglichen auf molarer Basis, während im Fettzelltest nur 65 % gefunden werden. Die verstärkte und verlängerte Insulinwirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen gegenüber natürlichem Insulin wird besonders im Versuch an
- 25
- 30 der adrenaletomierten Streptoratte deutlich.

- Mit den neuen Insulinderivaten hat der Arzt erstmals Verbindungen in der Hand, die die bekannte anabole Insulinwirkung bevorzugt am Muskelgewebe und weniger am Fettgewebe entfalten. Damit ist ein schon lange gesuchter Wirkungssplit erreicht.
- 35

030067/0395

-9-

Darüber hinaus besitzen die erfindungsgemäßen Insulinderivate eine stark verminderte Antigenität.

- Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Herstellung der neuen Verbindungen. Als Ausgangsmaterial können Insuline verschiedener Spezies wie Rind, Schwein oder Mensch dienen.

Beispiel 1

10 B1-Methyl-PEG(1500)-carbonylamino-hexamethylenaminocarbonyl-insulin (Rind)

a) Monoisocyanat aus Methylpolyäthylenglykol (1500) und Hexamethylendiisocyanat

- 15 15 g Monomethylpolyäthylenglykol (MG 1500) werden in 200 ml Benzol in der Wärme gelöst. Die Lösung wird mit 1 ml Dibutylzinnlaurat und 8,6 ml Hexamethylendiisocyanat versetzt und 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wird das Produkt durch Zusatz von Petroläther
- 20 gefällt, der Überstand dekantiert, der Feststoff in Toluol gelöst und die Lösung erneut mit Petroläther versetzt. Die Fällung wird noch zweimal wiederholt, das Produkt wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 14,6g; Charakterisierung durch IR-Spektrum
- 25 ( $1705\text{ cm}^{-1}$  Amid;  $2260\text{ cm}^{-1}$  Isocyanat).

- b) 200 mg N<sup>α</sup>A1, N<sup>β</sup>B29-Bis-Boc-insulin vom Rind, hergestellt nach der DPS 2 162 164, werden in 3 ml Dimethylformamid, das 0.2 ml N-Ethylmorpholin enthält, mit 400 mg
- 30 der oben hergestellten Verbindung 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man fällt mit Ether einen Niederschlag aus und wäscht ihn mit Ether und Essigester. Ausbeute nach dem Trocknen im Vak. 278 mg. Da das Produkt elektrophoretisch hinreichend einheitlich ist,
- 35 kann auf eine chromatographische Reinigung verzichtet werden.

030067/0395

-8- 10

- Zur Abspaltung der Schutzgruppen löst man das Produkt in 2 ml Trifluoressigsäure und fällt nach 45 Minuten Stehen bei Raumtemperatur mit Ether 243 mg Reaktionsprodukt aus. Nach Lösen des Präzipitats in 2 ml 0,1 M Ammonacetat/
- 5 0,1 N Essigsäure wird die Lösung über eine Säule Sephadex<sup>(R)</sup>-G-50 superfine 1 x 50 cm mit 0,1 M Ammonacetat/0,1 N Essigsäure chromatographiert. Ausbeute: 218 mg.

- Die Verbindung ist in der Papierelektrophorese bei pH 2
- 10 einheitlich und verhält sich erwartungsgemäß wie ein monoacyliertes Insulin.

### Beispiel 2

- 15 B1-Methyl-PEG (500)-succinoyl-insulin (Schwein)
- a) Bernsteinsäure-mono-methylpolyäthylenglykolester (500)
- 15 g Mono-methylpolyäthylenglykol (500) werden in 40 ml Methylenchlorid gelöst, 5 g Bernsteinsäureanhydrid zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.
- 20 Danach wird das Reaktionsgemisch noch 1 Stunde am Rückfluß gekocht. Nach Erkalten wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 5 g-Portionen in Methanol gelöst und über Sephadex LH 20 in Methanol chromatographiert. Die Substanz wird im Dünnschicht-
- 25 chromatographie - System Methylenchlorid/Diäthylenglykolmonomethyläther/Pyridin (85:15:2 v/v) auf Reinheit überprüft. IR-Spektrum:  $1740\text{ cm}^{-1}$ .
- b) Bernsteinsäure-mono-methylpolyäthylenglykolester (500)-
- 30 mono-N-hydroxysuccinimidester
- 1,8 g (3 mmol) Bernsteinsäure-mono-methylpolyäthylenglykolester (500) werden in 20 ml Tetrahydrofuran gelöst und der Lösung 345 mg (3 mmol) N-Hydroxysuccinimid
- 35 und 620 mg DCC zugefügt. Die Mischung wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach vom ausgefallenen

030067/0395

-8- 11

Niederschlag befreit. Sodann wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, das zurückbleibende Öl mit Äther überschichtet und zur Kristallisation auf  $-20^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Der Überstand wird abdekantiert und der kristalline Rückstand auf Raumtemperatur erwärmt, wobei die Kristalle wieder zerfließen. Diese Kristallisation wird wiederholt. Die Substanz kann unter trockenem Äther aufbewahrt werden. Ausbeute: 1,6 g. - Charakterisierung durch IR-Spektrum ( $1820, 1890, 1740\text{ cm}^{-1}$ ).

10

c) B1-Methyl-PEG (500)-succionyl-insulin (Schwein)

- 3,0 g  $\text{N}^{\text{A1}}$ ,  $\text{N}^{\text{B29}}$ -Bis-Msc-insulin vom Schwein, hergestellt nach Chem. Ber. 108 (1975), S. 2758, werden in 40 ml Dimethylformamid und 0,09 ml N-Ethylmorpholin gelöst. Man gibt 1,0 g Methyl-PEG (500)-succionyl-ONSu zu und rührt über Nacht bei Raumtemperatur.
- Zur Aufarbeitung versetzt man mit 0,1 ml Essigsäure, füllt das Reaktionsprodukt mit Ether und wäscht mit Methylchlorid und Ether. Ausbeute: 4,0 g.
- Die Feinigung erfolgt durch Verteilungschromatographie analog Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 354 (1973), S. 1285 in einer Säule 200 x 6 cm. Die Insulinkonzentration im Eluat wird über Messung der UV-Extinktion bei 254 nm verfolgt. Die Fraktionen des Hauptpeaks, die chromatographisch einheitlich sind (Dünnschichtchromatographie aus Kieselgel. Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser/Essig (60:45:14:3)) werden zusammengefaßt. Ausbeute: 2,1 g.
- Zur Abspaltung der Msc-Schutzgruppen löst man die vom Lösungsmittel befreite Substanz in 10 ml Dimethylformamid und versetzt bei  $0^{\circ}\text{C}$  unter Rühren mit 10 ml Methanol und 20 ml 1 N NaOH. Nach 45 sek. gibt man 20 ml 1 N Essigsäure zu und füllt mit Essigester/Ether (1:1) 2,0 g Insulinderivat aus, das analog Beispiel 2 durch Gelfiltration entsalzt wird. Ausbeute: 1,85 g.

-10- 12

Beispiel 3B1-Methyl-PEG(1500)-succinoyl-insulin (Schwein)

5 3.5 g N<sup>3</sup>A1, N<sup>6</sup>B29-Bis-Boc-insulin (Schwein) werden in einer Lösung von 40 ml Dimethylformamid und 0.09 ml N-Ethylmorpholin mit 8.0 g Methyl-PEG(1500)-succinoyl-ONSu, hergestellt analog Beispiel 2, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

10 Zur Aufarbeitung versetzt man mit 0.1 ml Essigsäure, fällt das Reaktionsprodukt mit Ether und wäscht es mit Methylenchlorid und Ether. Ausbeute: 4.5 g. Die Reinigung durch Verteilungschromatographie wird analog Beispiel 2 ausgeführt. Ausbeute: 2.8 g.

15 Man spaltet wie bei Beispiel 1 die Schutzgruppen ab und entsalzt wie bei Beispiel 2 angegeben. Ausbeute: 2.5 g. Die Reinheit der Verbindung in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese entspricht der von chromatographisch gereinigtem Insulin.

030067/0395